云 南 植 物 研 究　2008，30（6）：706～712
Acta Botanica Yunnanica　DOI：10.3724 SP.J.1143.2008.08037

苎麻细胞质雄性不育“三系”ISSR 特异片段克隆和序列分析

段继强[1,2]，李建永[1]，吴丽艳[1]，梁雪妮[1]，刘飞虎[1]
（1 云南大学 植物改良与应用实验室，云南 昆明　650091；2 怒江州食品药品监督管理局，云南 怒江　673100）

摘要：利用 ISSR 分子标记技术对苎麻细胞质雄性不育“三系”mtDNA 进行多态性分析；在选用的 38 个 ISSR 引物中，有 6 个引物的扩增产物在不育系、保持系和恢复系之间存在差异。对这些特异性片段进行克隆和序列测定，结果表明：片段 21-MS 全长 956 bp，包含一个 525 bp 的完整编码区，共编码 174 个氨基酸。片段 31-MR 全长 778 bp，包含一个 404 bp 的不完整编码区，共编码 134 个氨基酸；其核苷酸和氨基酸序列与已报道的多种植物中的番茄红素 β-环化酶基因分别存在 71%～76% 和 73%～77% 的同源性。

关键词：苎麻；线粒体 DNA；简单重复序列间区；番茄红素 β-环化酶；细胞质雄性不育
中图分类号：Q 75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700（2008）06-706-07

Cloning and Sequencing for ISSR Specific Fragments in Cytoplasmic Male Sterile, Maintainer and Restorer Lines of Ramie (*Boehmeria nivea*)

DUAN Ji-Qiang[1,2], LI Jian-Yong[1], WU Li-Yan[1], LIANG Xue-Ni[1], LIU Fei-Hu[1**]
(1 *Laboratory of Plant Improvement and Utilization, Yunnan University*, Kunming 650091, China;
2 *Nujiang Food and Drug Administration*, Nujiang 673100, China)

Abstract: The polymorphic analysis of mtDNA from ramie cytoplasmic male sterile (MS), maintainer (M) and restorer (R) lines (three lines) were performed by using ISSR technique. Thirty-eight ISSR primers were used for testing mtDNA polymorphism and different amplified bands were observed in six primers in ramie “three lines”, these specific bands were cloned and sequenced. Among those bands, the fragment 21-MS (GenBank accession number: EU122345) had 956 bp in total length and a 525 bp intact coding region that encoded a polypeptide consisting of 174 amino acids. Fragment 31-MR (GenBank accession number: EU122344) had 778 bp in total length and a 404 bp incompletely coding region that encoded a polypeptide consisting of 134 amino acids; this fragment had 71%-76% and 73%-77% of homology in nucleotide and amino acid sequences with lycopene beta-cyclase allozyme gene in many other plants.

Key words: Ramie (*Boehmeria nivea*); Mitochondrial DNA; Inter-simple sequence repeats (ISSR); Lycopene beta-cyclase allozyme (Lyc-b); Cytoplasmic male sterile line

高等植物的细胞质雄性不育（Cytoplasmic male sterility，CMS）是普遍存在的，到目前为止已在 300 多种植物中发现（Kaul，1988）。大量研究结果表明，CMS 属于母性遗传，与线粒体基因组密切相关，但雄性不育的生理学和遗传学机制还远未阐明。苎麻雄性不育特性早在 20 世纪

基金项目：国家科技基础条件平台建设子项目—重要野生植物种质资源采集保存技术规范和标准研制及整合共享（2005DKA21006）和国家自然科学基金项目（30360058）
通讯作者：Author for correspondence；E-mail：plantbreed2004@yahoo.com.cn
收稿日期：2008-03-13，2008-08-13 接受发表

作者简介：段继强（1981-）男，在读硕士研究生，主要从事植物基因工程与遗传育种研究。

60～70 年代就被发现存在于若干地方品种之中(李宗道，1989)。苎麻以收获营养体为目的，其杂种优势利用比其他收获种子的作物更为便利，因此备受育种工作者重视（刘飞虎等，1998；张中华等，2005)。苎麻雄性不育杂种优势组合已应用于生产，对其机理的研究主要集中在生理生化方面（周瑞阳，1999；刘飞虎等，2001；宋军等，2007)，但雄性不育的分子基础研究还罕见报道。ISSR（inter-simple sequence repeats）标记技术对简单重复序列（simple sequence repeats SSR）之间的 DNA 序列进行扩增。由于微卫星在基因组中广泛分布，而且等位变异特别丰富，ISSR 因此可以检测到基因组多个位点的差异，而且无需预知研究对象的基因组序列（何予卿等，2001)。

本实验采用 ISSR 分子标记技术对苎麻胞质雄性不育系（SS370)、保持系（GS13-X$_1$）和恢复系（细叶青）mtDNA 进行多态性比较，对相关特异性片段进行克隆和序列分析，探讨这些特异片段与苎麻 CMS 的关系，期望为揭示苎麻雄性不育的分子遗传学机制积累资料。

1　材料与方法

1.1　材料

选用苎麻（*Boehmeria nivea*（L.）Gaud.）胞质雄性不育系 SS370（A)、相应的保持系 GS13-X$_1$（B）和恢复系细叶青（R)。其中不育系和保持系为项目组成员在前期工作中从同一品种的孤雌生殖诱导后代中培育获得，恢复系则通过测交获得；不育系经遗传分析推测为核 - 质互作型不育（刘飞虎等，2000)。

1.2　试剂

ISSR 引物（加拿大哥伦比亚大学提供序列）由上海生工（Sangon）合成；dNTP、*Taq* 酶为 MBI 公司产品；pGEM-T 载体及 T4 连接酶购自 Promega 公司；DNA 分子量标准和胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存；其它试剂均为国产分析纯。

1.3　苎麻 mtDNA 提取

参考 Scotti 等（2001）的蔗糖衬垫法，并加以改进(段继强等，2008)。

1.4　ISSR-PCR 扩增

根据 ISSR 反应体系优化结果设定 20 μl PCR 反应体系：1× Taq 酶配套缓冲液，2.5 mmol L $MgCl^2$，1.5 U *Taq* 酶（MBI)，25 ng 模板 DNA，0.75 μmol L 引物，dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.15 mmol L。扩增程序为：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，52℃退火 45 s，72℃延伸 80 s，共 40 个循环；72℃完全延伸 10 min。

1.5　多态性比较分析

选用 38 个 ISSR 随机引物（加拿大哥伦比亚大学提供序列，序列（表 1)，先排除其中无条带和无多态性的引物，再对有多态性的引物作 2～4 次重复，最后选取重复性和稳定性较好的引物进行多态性比较分析。

1.6　特异条带的回收、克隆和测序

将差异片段用无菌消毒刀片在长波紫外灯下从琼脂糖凝胶上切下，用胶回收试剂盒进行纯化、回收。用 pGEM-T

表 1　使用的 ISSR 引物

Table 1　ISSR primers used in this study

Primer	Sequence	Primer	Sequence
ISSR-1	5′-(GCT)(AGT)(GCT)(CA)$_6$-3′	ISSR-22	5′-(CT)$_8$T-3′
ISSR-2	5′-(AGC)(ACT)(AGC)(GT)$_7$-3′	ISSR-23	5′-(CT)$_8$(AG)G-3′
ISSR-3	5′-(AGT)(GCT)(AGT)(GA)$_7$-3′	ISSR-24	5′-CGCC(GA)$_6$-3′
ISSR-4	5′-G(CA)$_4$C-3′	ISSR-25	5′-(GGGGT)$_3$-3′
ISSR-5	5′-(CT)$_8$(AG)G-3′	ISSR-26	5′-(GA)$_8$(CT)G-3′
ISSR-6	5′-(CT)$_8$(AG)C-3′	ISSR-27	5′-(AT)$_8$C-3′
ISSR-7	5′-CCC(GT)$_6$-3′	ISSR-28	5′-(GT)$_8$(CT)C-3′
ISSR-8	5′-G(GC)G(GT)$_6$-3′	ISSR-29	5′-(CT)$_8$(AG)C-3′
ISSR-10	5′-GC(AT)(GA)$_6$G-3′	ISSR-30	5′-(GAA)$_5$-3′
ISSR-11	5′-CCA(GAG)$_4$-3′	ISSR-31	5′-(AG)$_8$CG-3′
ISSR-12	5′-GCG(AC)$_6$A-3′	ISSR-32	5′-CCA(GAG)$_4$-3′
ISSR-13	5′-(TAT)$_5$-3′	ISSR-33	5′-GGA(GTG)$_4$-3′
ISSR-14	5′-(GGC)$_5$-3′	ISSR-34	5′-CCA(GTG)$_4$-3′
ISSR-15	5′-(AGC)$_5$-3′	ISSR-35	5′-(TG)$_8$(AG)G-3′
ISSR-16	5′-(ACTG)$_4$-3′	ISSR-36	5′-GCGCATATG(GACA)$_3$GC-3′
ISSR-18	5′-(TGCA)$_4$-3′	ISSR-37	5′-(GGAT)$_5$-3′
ISSR-19	5′-(GGGGT)$_3$-3′	ISSR-38	5′-(GATA)$_4$-3′
ISSR-20	5′-(AT)$_8$T-3′	ISSR-39	5′-(CAG)$_5$-3′
ISSR-21	5′-(CA)$_8$(AG)T-3′	ISSR-40	5′-(GGAGA)$_3$-3′

克隆载体连接并转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中；涂布于加有氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 的抗性 LB 平板上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落，在液体 LB 培养基中扩大繁殖。用碱裂解法（王关林和方宏筠，2002）从菌液中提取质粒，以通用测序引物 T7 和 SP6 进行常规 PCR 检测。对阳性克隆进行序列测定（由上海生工代为完成）。

1.7　序列分析

将测序得到的核苷酸序列用开放阅读框（Open Reading Frame，ORF）分析软件 ORF Finder（http: www.ncbi.nlm.nih.gov projects gorf）查找其编码区（即 ORF）；登陆 GenBank，用 BLAST 程序（http: www.ncbi.nlm.nih.gov BLAST）对其核苷酸序列及编码的氨基酸序列进行同源性检索分析。

2　结果与分析

2.1　苎麻 mtDNA 纯度和完整性

经琼脂糖凝胶电泳、EB 染色后可在紫外灯下观察到 23 kb 左右的 mtDNA 带，所含杂质少，没有出现大量降解的现象，说明通过上述提纯方法，能得到相对完整的线粒体 DNA（图 1）。

根据经验数据，OD_{260} OD_{280} 比值在 1.7～1.9 之间时，DNA 的纯度较高（金冬雁和黎孟枫译，1996）。测定所提取的 mtDNA 的 OD_{260} OD_{280}，SS370 为 1.84，GS13-X_1 为 1.78，细叶青为 1.68，说明所提取的 mtDNA 的纯度较高，可满足后续实验的需要。

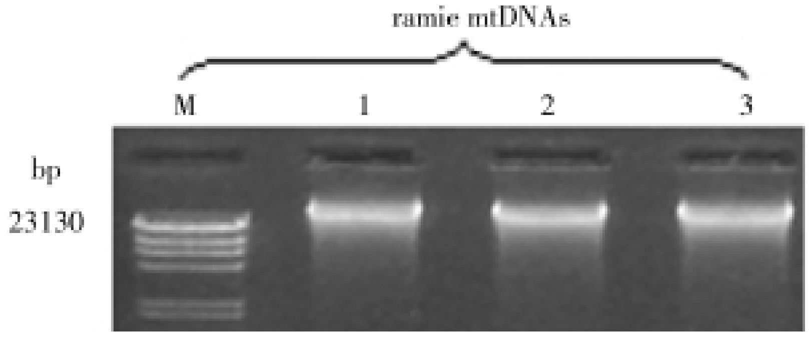


图 1　苎麻 mtDNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1　Electrophoresis of ramie mtDNAs on agarose gel

M：λ DNA *Hind* Ⅲ DNA 标准分子量；1：SS370（雄性不育系）；2：GS13-X_1（保持系）；3：细叶青（恢复系）

M：λ DNA *Hind* Ⅲ DNA Marker；1：SS370（Male sterile）；2：GS13-X_1（Maintainer）；3：Xi Ye-Qing（Restorer）

2.2　苎麻“三系”mtDNA 的多态性分析结果

在选用的 38 个引物中，有 6 个无扩增产物或扩增产物带谱不清晰，其它引物均能扩增出 1～6 条清晰可辨的条带。初选出 15 个具多态性的引物，再经多次重复，只有 6 个引物能够扩增出具有较高稳定性和重复性的多态性条带（图 2）。

2.3　ISSR 特异片段的克隆及重组结果

回收并克隆引物 ISSR-21 的扩增产物中不育

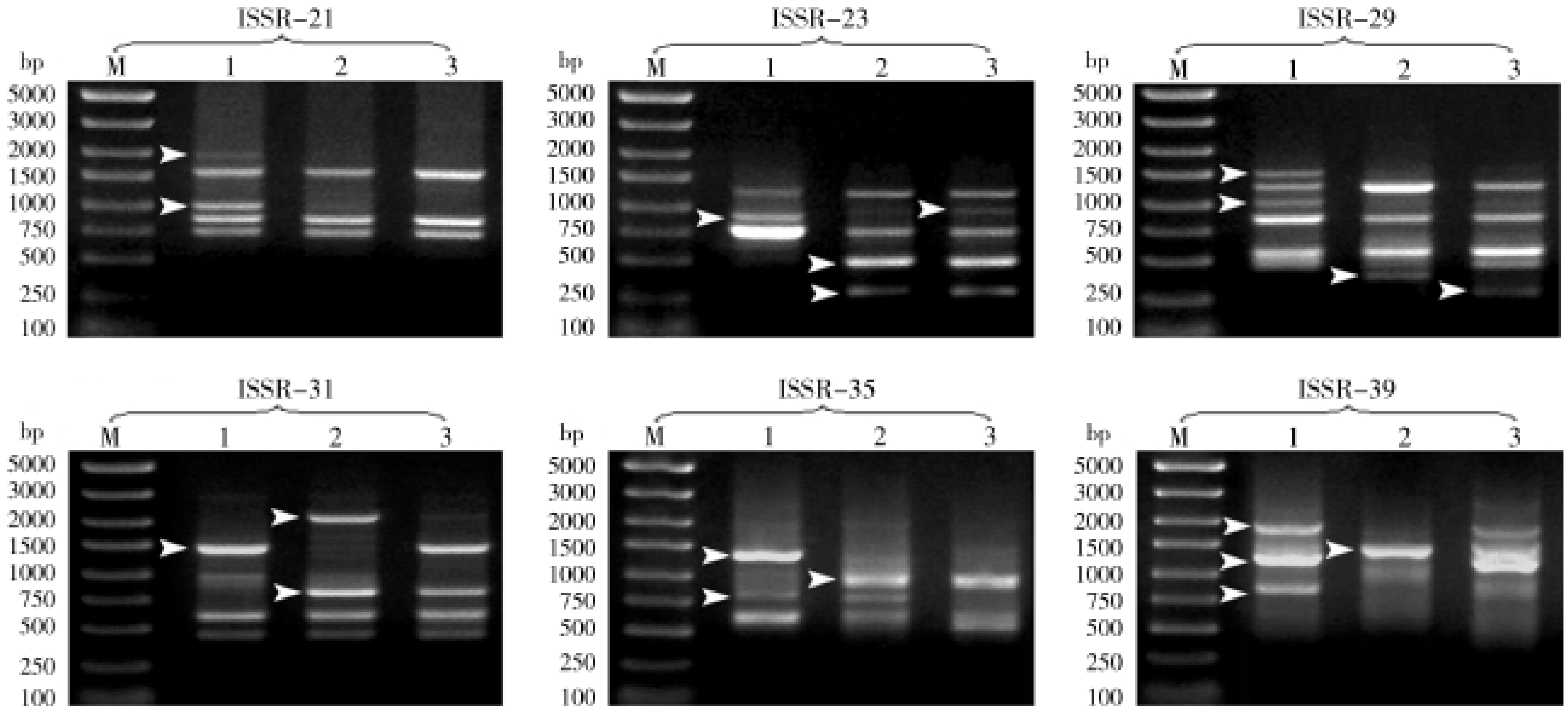


图 2　苎麻“三系”mtDNA 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 2　ISSR-PCR amplification of mtDNAs in ramie male sterile, maintainer and restorer lines

M. $DL250^{+}$ DNA 标准分子量；1. SS370；2. GS13-X_1；3. 细叶青；白色箭头指示多态性条带

M. $DL250^{+}$ DNA Marker；1. SS370（male sterility）；2. GS13-X_1（maintainer）；3. Xi Ye-Qing（restorer）；White arrows mark the polymorphic bands

系特异多出约 1 000 bp 的条带（命名为：21-MS，下同）；引物 ISSR-23 的扩增产物中不育系特异多出约 900 bp 的条带（23-MS）；保持系和恢复系均多出约 500 bp 的条带（23-M R01）和 250 bp 的条带（23-M R02）；引物 ISSR-31 的扩增产物中保持系和恢复系均多出约 750 bp 的条带（31-M R）；引物 ISSR-35 的扩增产物中不育系特异多出约 1 400 bp 的条带（35-MS），保持系和恢复系均多出约 1 000 bp 的条带（35-M R）。

以通用测序引物 T7 和 SP6 对重组质粒进行常规 PCR 检测，得到一条与预期大小相符的扩增片段（图 3），说明目的片段已成功地插入到了 pGEM-T 克隆载体中，选取其中的阳性克隆进行序列测定（3～5 个重复）。

2.4　ISSR 特异片段序列分析结果

测序结果经分析后，除片段 21-MS 序列和 31-M R 序列外，其它的 5 个特异片段均为无研究意义的非编码序列。

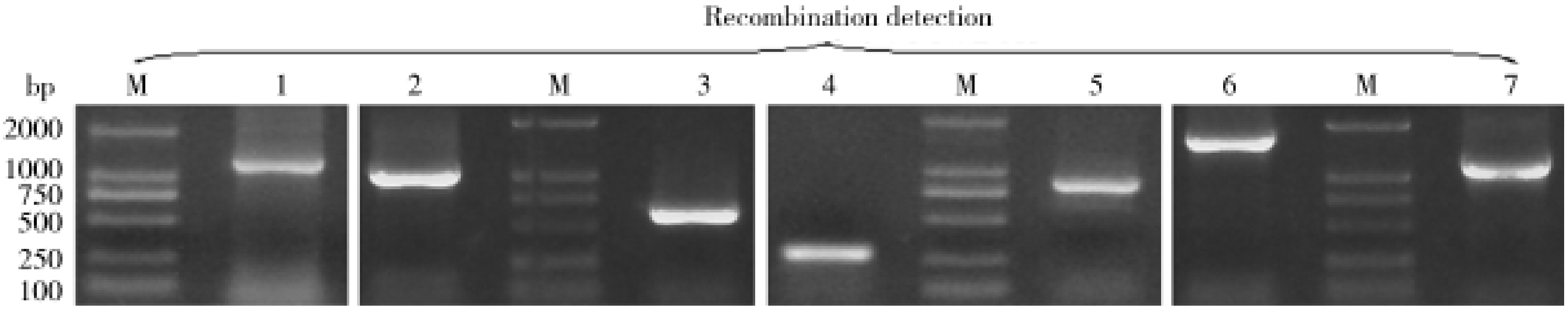
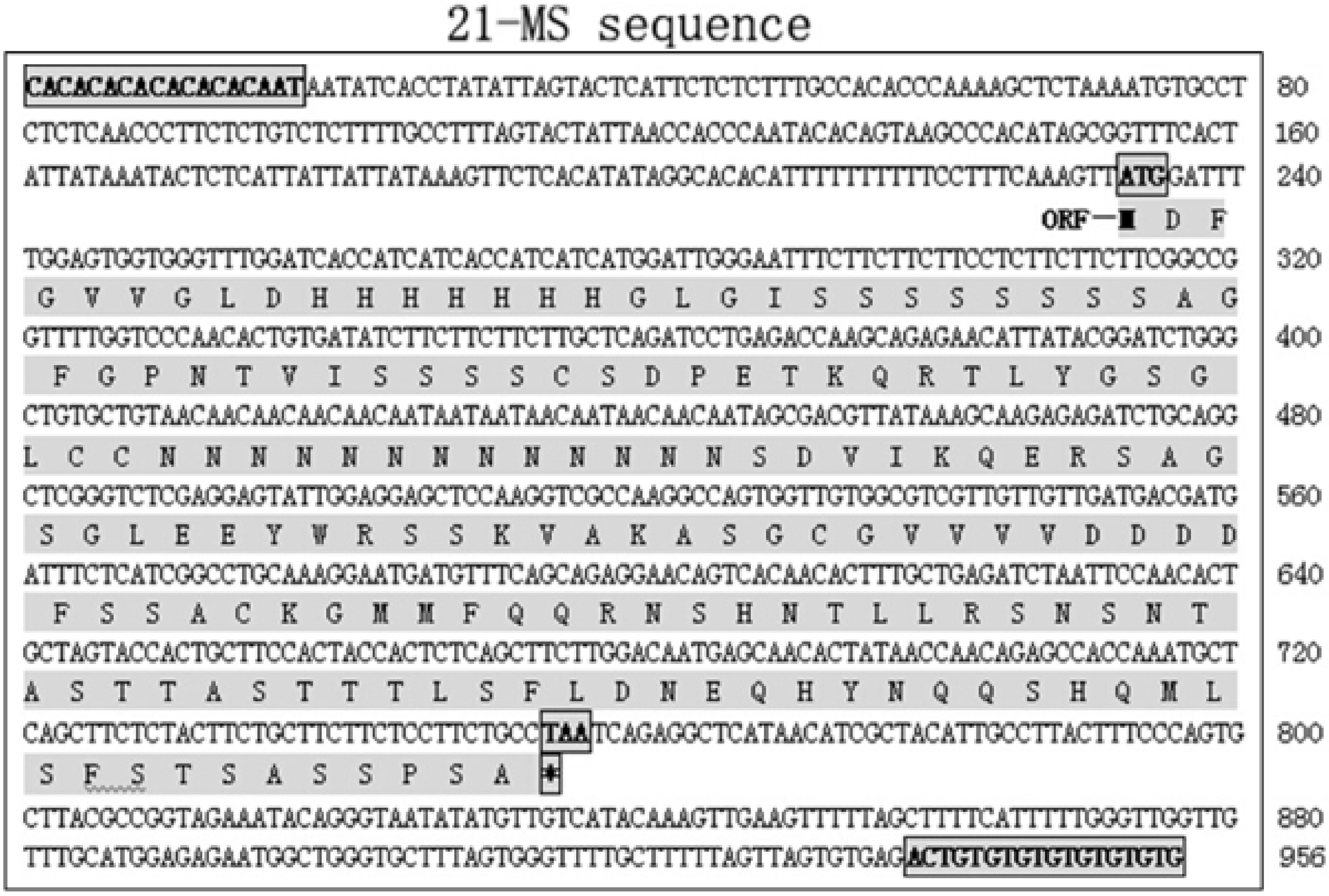


图 3　苎麻“三系”ISSR 特异片段重组检测

Fig . 3　Recombination detection of specific fragments from mtDNA of ramie male sterile, maintainer and restorer lines

M . D2000 DNA 标准分子量；1 . 21-MS；2 . 23-MS；3 . 23-M R01；4 . 23-M R02；5 . 31-M R；6 . 35-MS；7 . 35-M R

M：D2000 DNA Marker；1 . 21-MS；2 . 23-MS；3 . 23-M R01；4 . 23-M R02；5 . 31-M R；6 . 35-MS；7 . 35-M R



21-MS sequence

```
CACACACACACACACAATAATATCACCTATATTAGTACTCATTCTCTCTTTGCCACACCCAAAAGCTCTAAAATGTGCCT   80
CTCTCAACCCTTCTCTGTCTCTTTTGCCTTTAGTACTATTAACCACCCAATACACAGTAAGCCCACATAGCGGTTTCACT   160
ATTATAAATACTCTCATTATTATTATAAAGTTCTCACATATAGGCACACATTTTTTTTTTCCTTTCAAAGTTATGGATTT   240
                                                                      ORF—M  D  F
TGGAGTGGTGGGTTTGGATCACCATCATCACCATCATCATGGATTGGGAATTTCTTCTTCTTCCTCTTCTTCTTCGGCCG   320
 G  V  V  G  L  D  H  H  H  H  H  H  H  G  L  G  I  S  S  S  S  S  S  S  S  A  G
GTTTTGGTCCCAACACTGTGATATCTTCTTCTTCTTGCTCAGATCCTGAGACCAAGCAGAGAACATTATACGGATCTGGG   400
 F  G  P  N  T  V  I  S  S  S  S  C  S  D  P  E  T  K  Q  R  T  L  Y  G  S  G
CTGTGCTGTAACAACAACAACAACAATAATAATAACAATAACAACAATAGCGACGTTATAAAGCAAGAGAGATCTGCAGG   480
L  C  C  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  S  D  V  I  K  Q  E  R  S  A  G
CTCGGGTCTCGAGGAGTATTGGAGGAGCTCCAAGGTCGCCAAGGCCAGTGGTTGTGGCGTCGTTGTTGTTGATGACGATG   560
 S  G  L  E  E  Y  W  R  S  S  K  V  A  K  A  S  G  C  G  V  V  V  V  D  D  D  D
ATTTCTCATCGGCCTGCAAAGGAATGATGTTTCAGCAGAGGAACAGTCACAACACTTTGCTGAGATCTAATTCCAACACT   640
 F  S  S  A  C  K  G  M  M  F  Q  Q  R  N  S  H  N  T  L  L  R  S  N  S  N  T
GCTAGTACCACTGCTTCCACTACCACTCTCAGCTTCTTGGACAATGAGCAACACTATAACCAACAGAGCCACCAAATGCT   720
A  S  T  T  A  S  T  T  T  L  S  F  L  D  N  E  Q  H  Y  N  Q  Q  S  H  Q  M  L
CAGCTTCTCTACTTCTGCTTCTTCTCCTTCTGCCTAATCAGAGGCTCATAACATCGCTACATTGCCTTACTTTCCCAGTG   800
 S  F  S  T  S  A  S  S  P  S  A  *
CTTACGCCGGTAGAAATACAGGGTAATATATGTTGTCATACAAAGTTGAAGTTTTTAGCTTTTCATTTTTGGGTTGGTTG   880
TTTGCATGGAGAGAATGGCTGGGTGCTTTAGTGGGTTTTGCTTTTTAGTTAGTGTGAGACTGTGTGTGTGTGTGTG   956
```

图 4　苎麻不育系特有片段 21-MS 核苷酸序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

Fig . 4　Nucleotide sequence of specific fragment 21-MS from ramie male sterile line and the amino acid sequence encoded by its ORF

Long gray frame shows the primer sequence; short gray frame shows the start codon and stop codon;

gray shade shows the ORF deduced amino acid sequence

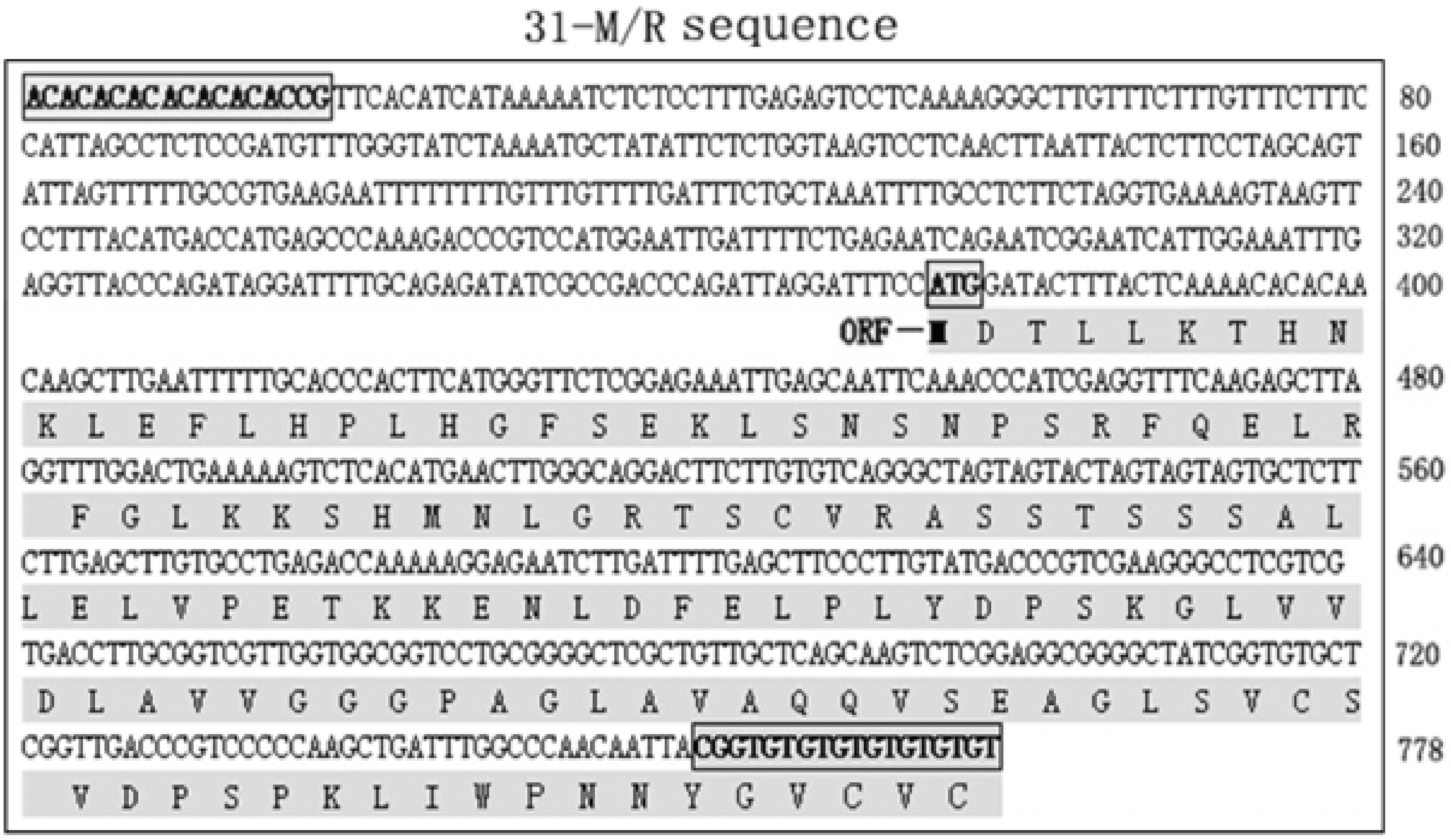


图 5 苎麻保持系与恢复系特有片段 31-M R 核苷酸序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

Fig . 5 Nucleotide sequence of specific fragment 31-M R from ramie maintainer and restorer lines and the amino acid sequence encoded by its ORF

Long gray frame shows the primer sequence; short gray frame shows the start codon; gray shade shows the ORF deduced amino acid sequence

片段 21-MS 序列 (GenBank 登陆号: EU122345) 全长 956 bp, A + T 含量为 57.85%。序列包含一个 525 bp 的完整编码区 (即 ORF, 位于 233 bp～757 bp 区域), 共编码 174 个氨基酸 (图 4)。

片段 31-M R 序列 (GenBank 登陆号: EU122344) 全长 778 bp, A + T 含量为 55.14%。序列包含一个 404 bp 的不完整编码区 (位于 375 bp～777 bp 区域), 共编码 134 个氨基酸 (图 5)。

BLAST 分析表明, 21-MS 的核苷酸序列及其 ORF 编码的氨基酸序列与以知基因同源性均低于 50%, 表明该片段为不育系 (SS370) 特有的新序列。31-M R 中的一段核苷酸序列 (位于 365 bp～773 bp 区域, 长 409 bp) 与甜橙 (*Citrus sinensis*, AY679168)、葡萄 (*Vitis vinifera*, AM432668)、温州蜜橘 (*Citrus unshiu*, AY166796)、番木瓜 (*Carica papaya*, DQ415894)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, X81787) 等多种植物中番茄红素 β-环化酶 (lycopene beta-cyclase allozyme, Lyc-b) 基因部分序列存在 71%～76% 的同源性 (表 2); 其 ORF 编码的氨基酸序列与甜橙 (AAU05146)、温州蜜橘 (AAN86060)、葡萄 (CAN69313)、番木瓜 (ABD91578)、烟草 (CAA57386) 等多种植物中 Lyc-b 的部分氨基酸序列存在 73%～77% 的同源性 (表 2, 图 6)。

表 2 苎麻保持系和恢复系特有片段 31-M R 核苷酸及其编码氨基酸序列与其它植物 Lyc-b 基因同源性比较

Table 2 Homology of nucleotide and deduced amino acid sequences of specific fragment 31-M R from ramie maintainer and restorer lines with Lyc-b gene from other plants

Taxon	Homology in nucleotide sequence (%)	Homology in amino acid sequence (%)
Citrus sinensis	76	75
Citrus unshiu	75	75
Vitis vinifera	75	77
Carica papaya	74	73
Nicotiana tabacum	71	74

3 讨论

导致植物细胞质雄性不育的因素可能不止一种。从前人研究结果来看, CMS 与线粒体基因组的结构变化和新的嵌合基因的产生有关, 而其中已经鉴定的与 CMS 相关的嵌合基因大多与 ATP

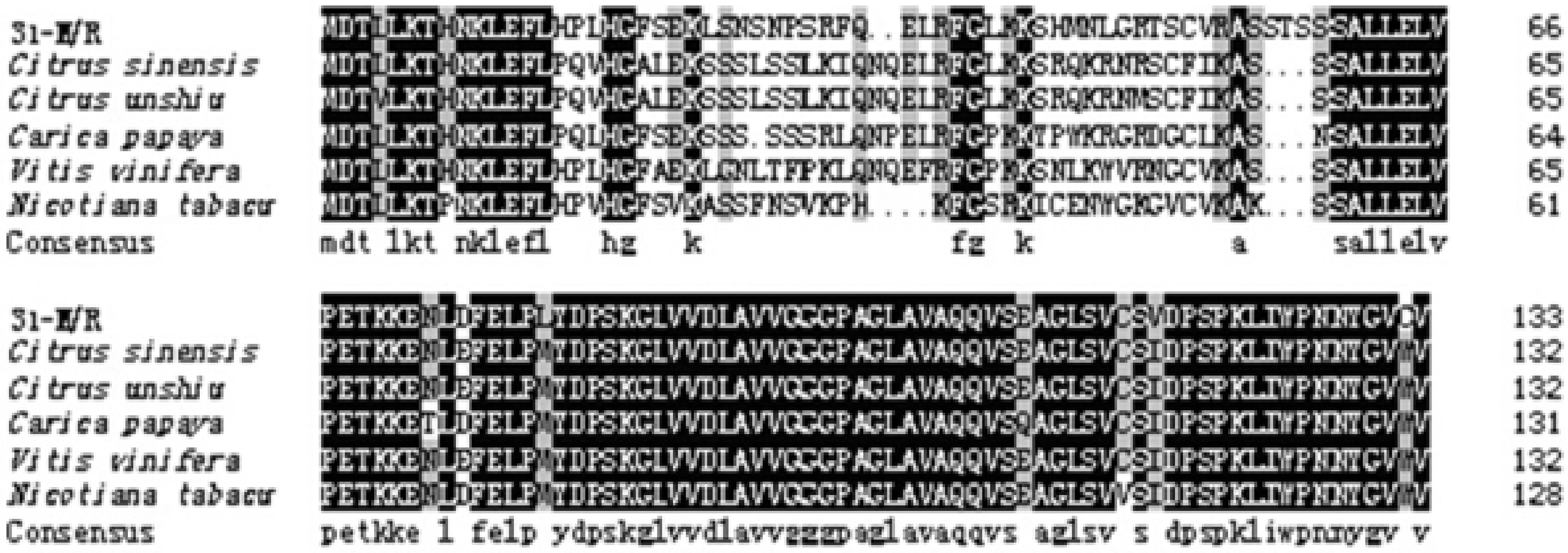


图 6　苎麻保持系和恢复系特有片段 31-M R 中 ORF 编码的氨基酸序列与其它植物 Lyc-b 氨基酸序列同源性比较

Fig . 6　Homology of amino acid sequence deduced from OFR of specific fragment 31-M R from ramie maintainer and restorer lines with that of Lyc-b gene from other plants . Black shades mean 100 % similarity; gray shades mean 75 % similarity

合成酶或细胞色素 C 氧化酶有关，如碧冬茄中 *Cox* 基因以及其他植物 *atpA*、*atp*6、*atp*9 基因等 (Pruitt 等，1989；Kadowaki 等，1990；Kohler 等，1991；Mobr 等，1993；Hanson and Bentolia，2004；Kim 等，2006)。前人对 CMS 的研究多用 RAPD (杨剑波等，2003；王小利等，2005；张德双等，2006) 和 RFLP (Kadowaki and Harada，1989；危文亮等，2005；黄威等，2006) 等技术，利用 ISSR 技术对 CMS 的研究少见报道。

本研究利用 ISSR 分子标记技术对苎麻 CMS “三系”mtDNA 进行了多态性比较分析，在 6 个 ISSR 引物中找到了不育系、保持系和恢复系之间的差异片段 (图 2)，这些片段中有不育系特异缺失的，也有不育系特异多出的。序列分析结果表明特异片段 21-MS 为不育系特有的新序列。特异片段 31-M R 的编码区与一些植物的 Lyc-b 基因存在较高的同源性 (图 6)，而 Lyc-b 是将线性番茄红素转化为具环类胡萝卜素的关键酶 (梁燕等，2002)。植物中类胡萝卜素作为光捕获辅助色素和光氧化作用保护剂，在光合作用中发挥重要作用；同时它也是构成花、果色泽的主要色素；有些类胡萝卜素还是 ABA 合成的前体 (Rock and Zeevaart，1991)。若类胡萝卜素的合成受到抑制，将会直接影响植物的正常生长发育，而不育系中 Lyc-b 基因序列发生了变异。不育系与可育系是否是因 Lyc-b 基因表达的差异造成的还需以后更多的实验证据来证明。

〔参　考　文　献〕

马学军，舒跃龙，2005 . 精编分子生物学实验指南 (第 4 版) [M] . 北京：科学出版社，56

王关林，方宏筠，2002 . 植物基因工程 (第二版) [M] . 北京：科学出版社，734—735

李宗道，1989 . 苎麻生理生化与遗传育种 [M] . 北京：中国农业出版社，158—167

金冬雁，黎孟枫译 (Sambrook J，Fritsch EF，Maniatis T *et al.*，1995)，1996 . 分子克隆实验指南 (第二版) (Molecular Clone: a Laboratory Manual，2th ed) [M] . 北京：科学出版社，956

Hanson MR，Bentolia S，2004 . Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J] . *Plant Cell*，16：S154—S169

He YQ (何予卿)，Zhang Y (张宇)，Sun H (孙海) *et al.*，2001 . Studies on the relation ship between cultivated and wild Rice using ISSR markers [J] . *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报)，9 (2)：123—127

Huan W (黄威)，Wang L (汪莉)，Yi P (易平) *et al.*，2006 . RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS-Rice [J] . *Acta Genet Sin* (遗传学报)，33 (4)：330—338

Kadowaki K，Harada K，1989 . Differential organization of mitochondrial gene in rice with normal and male-sterile cytoplasms [J] . *Jpn J Breed*，30：179—186

Kadowaki K，Suzuki T，Kazames SA，1990 . Chimeric gene containing the 5′ portion of *atp*6 is associated with cytoplasmic male sterility of rice [J] . *Mol Gen Genet*，224：10—16

Kaul MLH，1988 . Male Sterility in Higher Plants [M] . Berlin: Springer Verlag Press

Kim DH，Kim BD，2006 . The organization of mitochondrial *atp*6 gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L .) [J] . *Curr Genet*，49：59—67

Kohler RH, Horn R, Loss A *et al.*, 1991. Cytoplasm male sterility in sun flower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene [J]. *Mol Gen Genet*, 227: 369—376

Liang Y (**梁燕**), Wang M (**王鸣**), Chen H (**陈杭**) *et al.*, 2002. The characteristics functions and relation ships of LYCs in plant [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (**西北植物学报**), 22 (4): 993—998

Liu FH (**刘飞虎**), Liang XN (**梁雪妮**), Huang HQ (**黄海泉**), 1998. Identification of fertility in ramie male sterile line [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi* (**江西农业大学学报**), 20 (2): 197—198

Liu FH (**刘飞虎**), Liang XN (**梁雪妮**), Zhang SW (**张寿文**), 2001. Analyses for ecology, biochemistry and genetics of ramie (*Boehmeria nivea*) male sterile lines [J]. *J Plant Genetic Res* (**植物遗传资源科学**), 2 (4): 1—7

Liu FH (**刘飞虎**), Liang XN (**梁雪妮**), Zhang SW (**张寿文**) *et al.*, 2000. Identification and heredity analysis of sterility for ramie male sterile lines [J]. *China's Fiber Crops* (**中国麻业**), 22 (1): 6—9

Mohr S, Schulte-Kappert E, Odenbach W *et al.*, 1993. Mitochondria DNA of cytoplasmic male sterile triticum timopheevi: rearrangement of upstream sequence of the *atp*6 and *orf*25 genes [J]. *Theor Apple Genet*, 86: 259—268

Pruitt KD, Hanson MR, 1989. Cytochrome oxidase subunit Ⅱ sequences in Petunia mitochondria: two intro-containing genes and intron-less pseudogene associated with cytoplasmic male sterility [J]. *Curr Genet*, 16: 281—291

Rock CD, Zeevaart JAD, 1991. The ABA mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy- carotenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7496—7499

Scotti N, Card T, Marechal-Drouard L, 2001. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 19: 67a—67h

Shong J (**宋军**), Zhang ZH (**张中华**), Pan GT (**潘光堂**), 2007. Physiological and biochemical characteristics in ramie male sterile lines [J]. *J Trop Subtrop Bot* (**热带亚热带植物学报**), 15 (5): 423—428

Wang XL (**王小利**), Zhang GS (**张改生**), Liu HW (**刘宏伟**) *et al.*, 2005. RAPD analysis of cytoplasmic male sterile lines of nian-type wheat [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (**西北植物学报**), 25 (4): 681—68

Wei WL (**危文亮**), Wang HZ (**王汉中**), Liu GH (**刘贵华**), 2005. Molecular identification of the sterile cytoplasm of NCa of a cytoplasmic male sterile line in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Sci Agric Sin* (**中国农业科学**), 38 (10): 1965—1972

Yang JB (**杨剑波**), Wang XF (**汪秀峰**), Zhao CS (**赵成松**) *et al.*, 2003. Cloning and sequencing analysis of the specific DNA fragment of mitochondria from maintainer of WA type rice [J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (**植物生理与分子生物学学报**), 29 (3): 199—205

Zhang DS (**张德双**), Zhang FL (**张凤兰**), Wang YJ (**王永健**) *et al.*, 2006. Cloning and sequencing for RAPD specific fragments in Chinese cabbage cytoplasmic male sterile [J]. *Chin Agric Sci Bull* (**农业生物技术科学**), 22 (2): 44—50

Zhang ZH (**张中华**), Wei G (**魏刚**), Yang Y (**杨燕**) *et al.*, 2005. Breeding and utilization of ramie male sterility line" C26 " [J]. *China's Fiber and Products* (**中国麻业**), 27 (3): 109—112

Zhou RY (**周瑞阳**), 1999. Genetic analysis on female sterility in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gand): The classification of phenotypes [J]. *Chinese Science Abstracts* (**中国学术期刊文摘**), 5 (8): 1053—1054

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymorase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 20: 176—183